

PAWEŁ MILNER<sup>1, A-D</sup>, GRAŻYNA GRZESIAK-JANAS<sup>1, B-C, E-F</sup>, STANISŁAW SPORNY<sup>2, A-C, E</sup>

## Antygen Ki-67 w ocenie aktywności proliferacyjnej zmian o nieokreślonym potencjale rozrostowym umiejscowionych w jamie ustnej\*

### Ki-67 Antigen in Evaluation of Proliferation Activity of Potentially Malignant Lesions Localized in Oral Cavity Mucosa\*

<sup>1</sup> Zakład Chirurgii Stomatologicznej UM w Łodzi, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska

<sup>2</sup> Zakład Patomorfologii Stomatologicznej UM w Łodzi, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska

A – koncepcja i projekt badania, B – gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – analiza i interpretacja danych, D – napisanie artykułu, E – krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Białko Ki-67 jest obecne we wszystkich fazach cyklu komórkowego w komórkach ulegających podziałom z wyjątkiem fazy G0. Oznaczenie jego obecności umożliwia wyznaczenie indeksu proliferacyjnego (IP) będącego dobrym wskaźnikiem prognostycznym w ocenie stopnia złośliwości badanych wycinków tkankowych.

**Cel pracy.** Analiza immunohistochemiczna aktywności proliferacyjnej 27 zmian o nieokreślonym potencjale rozrostowym umiejscowionych na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej z zastosowaniem przeciwciała anti-Ki-67 MIB-1.

**Materiał i metody.** 5-miesięcznym badaniem objęto 30 pacjentów (15 kobiet i 15 mężczyzn) w wieku 21–86 lat, u których stwierdzono zmiany o nieokreślonym potencjale rozrostowym umiejscowione na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej utrzymujące się powyżej 14 dni. U 27 osób pobrano wycinki lub wycięto zmiany w całości, 3 pacjentów odmówiło zgody na zabieg. Uzyskany materiał tkankowy utrwalono, przygotowano w formie preparatów mikroskopowych (do badania histopatologicznego oraz immunohistochemicznego z zastosowaniem przeciwciała anti-Ki-67 MIB-1) i poddano analizie patomorfologicznej. Ustalono rozpoznanie, dokonano oznaczenia wartości indeksu proliferacyjnego (IP) oraz oceny stopnia histologicznej złośliwości zmian.

**Wyniki.** W 5 przypadkach rozpoznano raka jamy ustnej, w których wartości IP wynosiły 80–90% (CM), a stopień złośliwości histopatologicznej oceniono na G1, G2 i G3. U jednego pacjenta rozpoznano w nabłonku wielowarstwowym płaskim dysplazję stopnia dużego, a IP wynosił 40% (CM). Pozostałe zmiany miały charakter łagodny. Rozpoznano 1 przypadek kostniaka, w którym IP oszacowano na 2% (CM). Pozostałymi jednostkami chorobowymi były: nadziąsłaki, torbiele, ziarniniaki, włókniakowatość dziąseł oraz stany zapalne. W tych przypadkach wartości IP nie przekraczały 60% w warstwie podstawnej nabłonka.

**Wnioski.** Ustalenie indeksu proliferacyjnego (IP) na podstawie wykonanych badań immunohistochemicznych z zastosowaniem przeciwciała anti-Ki-67 MIB-1 zapewnia precyzyjną i obiektywną ocenę charakteru biologicznego badanych zmian. Duże wartości indeksu proliferacyjnego (80–90%) zwykle świadczą o złośliwości procesu nowotworowego i jego szybkiej dynamice wzrostu (*Dent. Med. Probl.* 2014, 51, 4, 486–492).

**Słowa kluczowe:** Ki-67, zmiany przedrakowe, chirurgia stomatologiczna.

#### Abstract

**Background.** Ki-67 protein is present in all phases of human cell cycle in cells undergoing division except for G0 phase. Immunohistochemical binding of anti-Ki-67 antibody with this protein allows to determine index of proliferation (IP). This parameter is a good prognostic factor in evaluation of the level of malignancy in tissue biopsate collected from potentially malignant lesions.

\* Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi w ramach działalności statutowej nr 503/2-163-01/503-01.

**Objectives.** The aim of the study was immunohistochemical analysis of proliferation activity in 27 potentially malignant lesions localized in oral cavity using anti Ki-67 MIB-1 antibody.

**Material and Methods.** The 5-month study was conducted on a group of 30 adult patients (15 women and 15 men) aged between 21 and 86 years with potentially malignant lesions persistent more than 14 days on a surface of oral cavity mucosa. 27 surgical biopates were collected or total surgical excision was performed (3 patients refused to agree to this procedure). Obtained tissue material was sent to the laboratory and prepared as microscope slides for histopathological and immunohistochemical (anti-Ki-67, MIB-1) examination. Pathomorphological diagnosis was set, proliferation index was counted and level of histological malignancy was evaluated.

**Results.** In 5 cases oral cancer was diagnosed with index of proliferation (IP) values 80–90% CM (all tissue mass), histopathological malignancy level was evaluated as G1, G2 and G3. One diagnosis of advanced dysplasia was set with IP level of 40% CM. Other lesions were classified as benign. One diagnosis of osteoma (IP 2% CM) was found. Remaining diagnoses were: epules, cysts, granulomas, fibromatosis *gingivae* and inflammation processes. IP values in these cases did not exceed 60% WP (in the basal layer of epithelium).

**Conclusions.** Determination of IP according to immunohistochemical examination of surgical biopats using anti-Ki-67 MIB-1 serum allows precise and objective evaluation of biological nature of potentially malignant lesions. High values of IP (80–90%) usually indicate tumor malignancy and dynamic growth potential (**Dent. Med. Probl.** 2014, 51, 4, 486–492).

**Key words:** oral surgery, Ki-67, potentially malignant lesions.

Antygen Ki-67 jest dużym, niehistonowym białkiem występującym w jądrze komórkowym. Składa się z łańcuchów polipeptydowych o masie cząsteczkowej 345 i 395 kD [1]. Charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania (ok. 1 godz.). Jego obecność stwierdza się w wielu komórkach prawidłowych tkanek, co jest związane z proliferacją komórkową będącą jednym z podstawowych procesów biologicznych. Informuje także o zdolności komórek do podziałów mitotycznych w określonym czasie. Wiele tkanek prawidłowych wykazuje względnie dużą aktywność proliferacyjną (np. warstwa podstawna nabłonka wielowarstwowego płaskiego lub nabłonek krypt jelitowych) [2].

Przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi Ki-67 ma nazwę wywodzącą się od miasta Kilonia, gdzie zostało zsyntetyzowane po raz pierwszy, a numer 67 jest oznaczeniem studzienki w płytce do hodowli tkankowej, w której zostało uwidocznione [3]. Monoklonalne przeciwciała MIB-1-3 zostały opisane przez Cattorettego et al. w 1992 roku [4], a następnie przez Keya et al. w 1993 r. [5]. Do ich produkcji użyto rekombinowanych fragmentów antygeny Ki-67, co doprowadziło do powstania przeciwciała anty-Ki-67, należącego do klasy Ig-1 immunoglobulin. Wykonanie odczynu immunohistochemicznego z zastosowaniem powyższej metody polega na zabarwieniu jąder komórkowych z uwydatnieniem jąder (ryc. 1). Otrzymane przeciwciała MIB-1 są najlepszym markerem proliferacyjnym, co potwierdziły liczne badania [6–8].

Obecność antygeny Ki-67 jest ściśle związana z cyklem komórkowym. Obecność białka Ki-67 stwierdzono we wszystkich fazach cyklu (G1, S, G2 i M) w komórkach ulegających podziałom z wyjątkiem fazy G0 [9]. Na podstawie analizy laboratoryjnej jego ilości w preparatach tkankowych można dokładnie określić frakcję wzros-

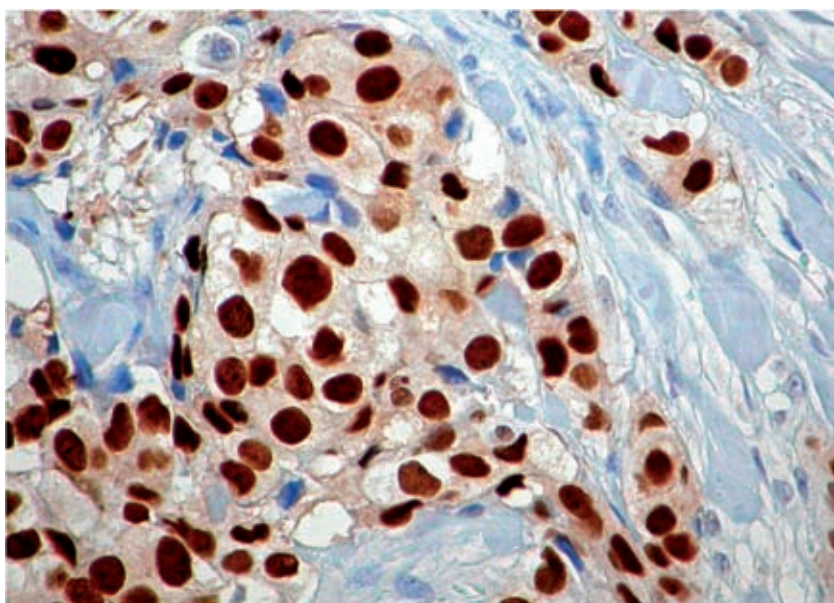
wą komórek prawidłowych, jak i nowotworowych. Może być też ono wykrywane w materiale histologicznym mrożonym (badanie wykonane śródoperacyjnie), parafinowym oraz w rozmazach cytologicznych [10].

Metody immunohistochemiczne obecnie są szeroko wykorzystywane ze względu na ich skuteczność i przydatność w praktyce patomorfologicznej poprzez wzbogacenie rozpoznania o histogenezę zmian patologicznych. Z tego względu są stosowane w ocenie aktywności proliferacyjnej zmian nowotworowych oraz nienowotworowych, w materiale histopatologicznym i cytologicznym. Wyniki oceny aktywności proliferacyjnej są wyrażone jako indeks proliferacyjny (IP) będący stosunkiem liczby komórek dodatnich (zabarwionych w badaniu immunohistochemicznym) do wszystkich zliczonych pod mikroskopem komórek, co wyraża się w procentach [11].

Celem pracy była analiza immunohistochemiczna aktywności proliferacyjnej 27 zmian o nieokreślonym potencjale rozrostowym umiejscowionych na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej, z zastosowaniem przeciwciała anty-Ki-67 MIB-1.

## Material i metody

Badanie wykonano w Zakładzie Chirurgii Stomatologicznej oraz Zakładzie Patomorfologii Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w ciągu 5 miesięcy: od 1.10.2013 r. do 1.03.2014 r. Grupę badaną stanowiło 30 pełnoletnich pacjentów w wieku 21–86 lat, u których stwierdzono zmiany o nieokreślonym potencjale rozrostowym umiejscowione na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej właściwej oraz przedsionka jamy ustnej i warg, utrzymujące się powyżej 14 dni. Po zebraniu wywiadu oraz wykonaniu badania zewnątrz-



**Ryc. 1.** Jądra komórkowe zabarwione w preparacie tkankowym metodą immunohistochemiczną z zastosowaniem surowicy anti-Ki-67 MIB-1; materiał własny, pow. 500×

**Fig. 1.** Cell nuclei after immunohistochemical staining using anti-Ki-67 MIB-1 serum; magnification 500×

i wewnątrzstnego przez specjalistę – chirurga szczękowego dokonano łącznie pobrania 27 wycinków tkankowych (lub wycięcia niewielkich zmian w całości). Trzech pacjentów nie wyraziło zgody na ten zabieg. Pobrany materiał tkankowy umieszczono w 10% wodnym roztworze zubożonej formaliny, a następnie przesłano do Zakładu Patomorfologii Stomatologicznej UM w Łodzi, gdzie przygotowano po dwa preparaty mikroskopowe dla każdego skrawka tkankowego: do badania histopatologicznego – zabarwionego hematoksyliną i eozyną, a do badania immunohistochemicznego wykonano odczyn z zastosowaniem przeciwciała anti-Ki-67 MIB-1 z użyciem maszyny DAKO Autostainer Link 48. Następnie preparaty zostały poddane ocenie przez patomorfologa przy zastosowaniu mikroskopu optycznego Olympus BX40, co pozwoliło na postawienie rozpoznania histopatologicznego oraz oznaczenie indeksu proliferacyjnego (IP). Na podstawie analizy uzyskanych wyników oceniono biologię poddanych diagnostyce zmian oraz przedstawiono pacjentom plan leczenia. Chorych, u których rozpoznano raka jamy ustnej skierowano w trybie pilnym do szpitala im. M. Kopernika w Łodzi w celu specjalistycznego leczenia onkologicznego.

## Wyniki

Rozkład 27 zmian o nieokreślonym potencjale rozrostowym w obrębie jamy ustnej z uwzględnieniem płci przedstawiono w tabeli 1. W tabeli 2 zaprezentowano rozpoznania histopatologiczne ustalone na podstawie analizy mikroskopowej 27 fragmentów tkankowych poddanych barwieniu hematoksyliną i eozyną w korelacji z oceną ich stopnia złośliwości histologicznej oraz uzyskanymi

wartościami procentowymi indeksu proliferacyjnego ustalonymi na podstawie analizy mikroskopowej preparatów poddanych barwieniu jąder komórkowych techniką immunohistochemiczną (odczyn z surowicą anti-Ki-67 MIB-1). Uwzględniono jego wartości osobno dla: WP – warstwy podstawnej, PN – podścieliska naczyniowego oraz w przypadku nieuporządkowanej architektury tkankowej

**Tabela 1.** Umieszczenie zmian w obrębie jamy ustnej z uwzględnieniem płci

**Table 1.** Localization of lesions in oral cavity including gender

Lokalizacja zmian w jamie ustnej (Localization of lesions in oral cavity)	Liczba przypadków (Number of cases)	Kobiety (Women)	Mężczyźni (Men)
Podniebienie miękkie	4	2	2
Wyrostek zębodołowy szczęki	4	2	2
Wyrostek zębodołowy żuchwy	3	2	1
Podniebienie twarde	3	2	1
Policzek	3	1	2
Język	4	2	2
Dno jamy ustnej	3	1	2
Cieść gardła	1	0	1
Warga górna	2	2	0
Warga dolna	1	0	1
Zmiana rozlana o zasięgu obejmującym dwie lub więcej z wymienionych lokalizacji	2	1	1

**Tabela 2.** Rozpoznanie patomorfologiczne uzyskane na podstawie badania histopatologicznego wycinków tkankowych pobranych z obszaru diagnozowanych zmian, ocena ich stopnia złośliwości histologicznej oraz uzyskane wartości indeksu proliferacyjnego wyrażone w % z uwzględnieniem płci

**Table 2.** Pathomorphological diagnoses obtained from histopathological analysis of tissue biopsies collected from area of diagnosed lesions, evaluation of histopathological malignancy level and Index of Proliferation values expressed in % including gender

Rozpoznanie patomorfologiczne (27 przypadków) (Pathomorphological diagnoses (27 cases))	Liczba przypadków (No. of cases)	K (W)	M (M)	Stopień złośliwości histopatologicznej (Histopathological malignancy level)	IP – indeks proliferacyjny w % (IP – Index of Proliferation in %)
Rak płaskonabłonkowy G-3	1	0	1	G3	CM 90
Rak płaskonabłonkowy G-2	2	1	1	(#1) G2 (#2) G2	(#1) CM 90 (#2) CM 80
Rak płaskonabłonkowy G-1 rogowaciejący	1	1	0	G1	CM 80
Naciek niskozróżnicowanego raka częściowo z różnicowaniem jasnokomórkowym	1		1	G1	CM 80
Kostniak	1	1	0	G0	CM 2
Przerost nierogowaciejącego nabłonka płaskiego z ogniskami dysplazji stopnia wysokiego	1	0	1	G0	CM 40
Zapalenie przewlekłe z włóknieniem	2	1	1	(#1) 0 (#2) 0	(#1) WP 50, PN 40 (#2) WP 40, PN 40
Nadziąsłak włóknisty	2	2	0	(#1, 2) 0	(#1, 2) WP 40, PN 40
Ziarniniak szczelinowaty	3	2	1	(#1) 0 (#2, 3) 0	(#1) WP 50 (#2, 3) WP 40
Ziarniniak ropotwórczy	2	1	1	(#1) 0 (#2) 0	(#1) WP 50, PN 20 (#2) WP 40, PN 10
Włókniakowatość dziąseł	4	3	1	(#1) 0 (#2, 3, 4) 0	(#1) WP 50 (#2, 3, 4) WP 40
Torbiel zawiązkowa	2	1	1	(#1) 0 (#2) 0	(#1) WP 50 (#2) WP 40
Torbiel korzeniowa	3	1	2	(#1, 2) 0 (#3) 0	(#1, 2) WP 50 (#3) WP 40
Torbiel zastoinowa (mukocela)	2	1	1	(#1) 0 (#2) 0	(#1) WP 50 (#2) WP 40

WP – warstwa podstawna nabłonka.

PN – podścielisko naczyń.

CM – cała masa tkankowa (cała masa guza).

WP – basal layer of epithelium.

PN – vascular endothelium.

CM – all tissue (tumor) mass.

CM – cała masa guza. W 5 przypadkach rozpoznano raka jamy ustnej, w których wartości IP wynosiły 80–90% (CM), a stopień złośliwości histopatologicznej oceniono na G1, G2 i G3. U jednego pacjenta rozpoznano w nabłonku wielowarstwowym płaskim dysplazję stopnia dużego, a IP wynosił 40% (CM). Pozostałe zmiany miały charakter łagodny. Rozpoznano 1 przypadek kostniaka, w którym IP oszacowano na 2% (CM). Pozostałymi jednostkami chorobowymi były: nadziąsłaki, torbiele, ziarniniaki, włókniakowatość dziąseł oraz stany zapalne. W tych przypadkach wartości IP nie przekraczały 60% w warstwie podstawnej nabłonka.

## Omówienie

Ustalenie indeksu proliferacyjnego (będącego wymiernym wskaźnikiem aktywności proliferacyjnej tkanki) jest dobrym wykładnikiem oceny stopnia złośliwości nowotworu i stanowi źródło informacji o znaczeniu prognostycznym. Parametr ten wyznacza się dla każdego analizowanego pod mikroskopem wycinka poprzez obliczenie odsetka komórek o dodatniej jądrowej ekspresji zastosowanego przeciwciała MIB-1 anti-Ki-67 do ogólnej liczby ocenianych komórek. W każdym wycinku ocenia się nie mniej niż 500

komórek [12]. Zastosowanie tego wskaźnika według Vilar et al. [11] ma duże znaczenie podczas kwalifikacji do leczenia, gdyż duży indeks proliferacyjny trafnie odzwierciedla wrażliwość komórek nowotworowych na chemio- lub radioterapię, a zastosowanie powyższych technik terapeutycznych może być nieskuteczne w leczeniu nowotworów o małym indeksie proliferacyjnym. Burcombe et al. [13] twierdzą, iż z klinicznego punktu widzenia jest istotny aspekt oceny tego indeksu przed leczeniem chirurgicznym oraz po nim, co umożliwia ocenę jego skuteczności. Wycięcie w całości zmiany oznacza bowiem wyleczenie lub przynajmniej długoletnie przeżycie pacjentów bez wystąpienia wznowy.

Diagnostyka patomorfologiczna nowotworów obszaru twarzoczaszki w dużym stopniu opiera się na ocenie cech mikroskopowych oraz określeniu typu histopatologicznego guza. Istotne jest również zestawienie jego obrazu morfologicznego z histopatologicznym stopniem złośliwości, co dostarcza informacji o biologii danego nowotworu [14]. Gdy cechy mikroskopowe w badanej tkance są niejednoznaczne, ocena złośliwości staje się subiektywna, co może skutkować błędnym rozpoznaniem i wyborem niewłaściwej terapii. Do postawienia błędnego rozpoznania może również dochodzić z powodu zbyt małej ilości materiału pobranego do analizy mikroskopowej lub heterogenicznej struktury nowotworu [15]. Opracowano wiele systemów służących do stopniowania złośliwości nowotworów. Właściwa jego ewaluacja powinna obejmować diagnostykę kliniczną, histopatologiczną oraz immunohistochemiczną. Z praktycznego punktu widzenia typ histopatologiczny nowotworu złośliwego nie odgrywa tak istotnej roli w leczeniu oraz rokowaniu jak jego kliniczne zaawansowanie. Ocena tego wskaźnika jest podstawowym czynnikiem rokowniczym w przypadku raka piersi, żołądka, jelita grubego, raka niedrobnokomórkowego płuca oraz czerniaka. Najszerszej stosowany oraz uniwersalny w tego typu klasyfikacji guzów litych jest system TNM (*Tumor, Nodes, Metastases*) [16]. Na podstawie wyników badania histopatologicznego można natomiast określić stopień złośliwości histopatologicznej nowotworu. Określa się go zazwyczaj symbolem „G” (*grade*). Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) proponuje podział na 3 lub 4 stopnie [17]: GX, G1, G2, G3 oraz G4. GX – brak możliwości wykonania oceny stopnia zróżnicowania. G1 – nowotwór wysoko zróżnicowany; wykazuje niewielką aktywność mitotyczną (poza miejscami fizjologicznie dzielącymi się występującą również w architekturze tkanek zróżnicowanych, w warunkach prawidłowych nieulegających podziałom), brak atypii oraz proliferacji podścieliska naczyńowego, nie występuje

również martwica tkanek, może mieć naciekający charakter wzrostu, istnieje tendencja do wytworzenia wznowy oraz odróżnicowywania się, czas przeżycia pacjentów bez wznowy wynosi około 5 lat. G2 – nowotwór względnie złośliwy, średnio zróżnicowany, stwierdza się znaczną aktywność mitotyczną, atypię jądrową, polimorfizm komórkowy, występuje proliferacja naczyń oraz niewielkie pola martwicy, guz charakteryzuje się naciekającym wzrostem z dużą tendencją do wznowy oraz odróżnicowywania się, czas przeżycia pacjentów wynosi około 2–3 lat. G3 – nowotwór złośliwy słabo zróżnicowany, mikroskopowo stwierdza się bardzo silnie zaznaczone cechy biologicznej złośliwości: atypię jądrową, polimorfizm komórkowy, proliferację naczyń oraz występujące licznie pola martwicy, zawsze następuje wznowa, guz charakteryzuje się szybkim, naciekającym wzrostem, a czas przeżycia chorych wynosi 6–15 miesięcy [18]. G4 – nowotwór złośliwy niezróżnicowany, wykazuje cechy zawarte w charakterystyce G3, jednak o większym nasileniu.

Niektóre guzy są określane jako G3–4 ze względu na występowanie stref o zróżnicowanym nasileniu patologii. Należy również wspomnieć, iż odrębne systemy stopniowania zostały wprowadzone do oceny guzów piersi, pęcherza moczowego, prostaty oraz wątroby.

Ze względu na specyfikę prowadzonych badań własnych obejmujących zmiany zarówno łagodne, jak i złośliwe zastosowano dodatkowe oznaczenie G0, co z histopatologicznego punktu widzenia oznacza zmianę łagodną niewykazującą żadnych cech złośliwości (brak atypii jąder oraz aktywności mitotycznej poza obszarami, w których występuje ona fizjologicznie w określonych proporcjach, np. w warstwie podstawnej nabłonka wielowarstwowego płaskiego IP wynosi fizjologicznie ok. 40–50%).

Określenie stopnia złośliwości histologicznej guza ma więc zasadnicze znaczenie dla rokowania choroby. Według Maheshwari et al. [19] wysoki wskaźnik indeksu proliferacji komórkowej oznaczony w metodzie immunohistochemicznej oznacza wartości powyżej 50% komórek wybarwionych, umiarkowany 30–50%, natomiast niski poniżej 30%.

Należy także podkreślić, że obecnie do zalet techniki immunohistochemicznej należą prostota i szybkość uzyskania wyników, co umożliwia badanie aktywności proliferacyjnej w materiale archiwalnym zgromadzonym w laboratorium w postaci bloczków parafinowych. Podczas przygotowania preparatów oraz stosowania tej metody nie następuje zniszczenie struktury komórkowej ani tkankowej, co umożliwia ocenę biologicznej aktywności stref nowotworu oraz ujawnienie ob-

szarów o największym nasileniu patologii. Badanie może być ponadto wykonywane na drobnym materiale tkankowym lub komórkowym, w tym uzyskanym za pomocą BAC (biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej) [20].

Do wad opisywanej techniki diagnostycznej można zaliczyć zmienność intensywności tego samego odczynu, co może utrudniać interpretację wyników. Metoda ta nie została bowiem ostatecznie wystandaryzowana, wobec czego rezultaty uzyskane w różnych laboratoriach nie są porównywalne. Według Eramach et al. [21] czynnikiem ograniczającym efektywność białka Ki-67 jako obiektywnego wskaźnika prognostycznego jest zbyt mała ilość materiału biopsyjnego, który nie zawsze jest reprezentatywny dla całego obszaru guza. Większość nowotworów składa się z kilku populacji komórek. W ich obrębie, w zależności od miejsca pobrania materiału, stwierdza się zatem różne współczynniki proliferacji. W celu wyboru optymalnego miejsca do pobrania wycinka tkankowego ze strefy o największym nasileniu patologii można zastosować badanie autofluorescencyjne tkanek, np. z użyciem urządzenia VELscope® VX, co umożliwia uwidocznienie tych obszarów.

Liczne publikacje [14, 18, 21–23] potwierdzają silną zależność między immunoreaktywnością białka Ki-67 a stopniem złośliwości histologicznej nowotworów. Motta et al. [22] na podstawie badania wykonanego na grupie 28 pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej stwierdzili, iż duże wartości indeksu proliferacyjnego są związane z guzami o większych rozmiarach, obecnością przerzutów do miejscowych węzłów chłonnych oraz ze złym rokowaniem. Według Bryanta et al. [14] oznaczanie antygenu Ki-67 jest skuteczną metodą w różnicowaniu łagodnych oraz złośliwych nowotworowych rozrostów limfoidalnych (w tym chłoniaków). Nabi et al. [18] zastosowali oznaczenie immunohistochemiczne antygenu Ki-67 na 50 wycinkach tkankowych pobranych z obszaru guzów nowotworowych odbytnicy i stwierdzili małe wartości indeksu proliferacyjnego w guzach niskozróżnicowanych w porównaniu z dużymi jego wartościami w guzach wysokozróżnicowanych. Wyniki te odbiegają od obserwacji własnych dotyczących nowotworów płaskonabłonkowych jamy ustnej, gdzie stwierdzono większe wartości indeksu proliferacyjnego w guzach o mniejszym zróżnicowaniu i większym histologicznym stopniu złośliwości. Eramach et al. [21] wykonali oznaczenie indeksu proliferacyjnego metodą immunohistochemiczną (również odczyn anty-Ki-67 MIB-1) na grupie 100 libijskich kobiet z rozpoznaniem rakiem piersi i stwierdzili dodatnią korelację dużej ekspresji białka Ki-67 z zaawansowanymi stadiami raka, nowotworami niskozróżnicowanymi, wystę-

pującymi przerzutami miejscowymi i odległymi oraz w przypadku wystąpienia wznowy. Według autorów nie stwierdzono natomiast korelacji między ekspresją Ki-67 a wiekiem pacjentek, podtypami histologicznymi guzów oraz ich wielkością czy rodzajem wykonanych zabiegów chirurgicznych (w przypadku wznowy). Park et al. [23] również zajmujący się badaniem immunohistochemicznym raka piersi, stwierdzili na grupie 194 norweskich kobiet, u których ustalono powyższe rozpoznanie, iż indeks proliferacyjny wyznaczony na podstawie ekspresji białka Ki-67 umożliwia określenie grup dużego oraz małego ryzyka do wystąpienia przerzutów nowotworowych, co ma istotne znaczenie dla dalszej terapii. Autorzy ci są zdania, że rokowanie choroby zależy w większym stopniu od stwierdzenia podwyższonej ekspresji białka Ki-67 w okolicznych węzłach chłonnych niż w pierwotnym ognisku guza.

Na podstawie wyników własnych stwierdzono, iż duże wartości indeksu proliferacyjnego (80–90%) w całej masie guza ze współistniejącymi znacznymi zaburzeniami architektury tkankowej (histopatologicznie nowotwory G2 i G3) przeważnie dowodzą znacznej złośliwości procesu nowotworowego. Umiarkowane wartości IP (50–60% w całej masie guza) wraz z niewielkimi zaburzeniami budowy tkankowej świadczą o umiarkowanej lub nieznacznie podwyższonej aktywności metabolicznej oraz proliferacyjnej, przy stosunkowo niewielkiej dynamice procesu rozrostowego, co wskazuje na ich łagodny charakter i zwykle dobre rokowanie. Stwierdzenie Indeksu Proliferacyjnego w podścielisku naczyniowym (10–20% PN) oraz w warstwie podstawnej nabłonka wielowarstwowego płaskiego (40–50% WP) może przemawiać za zapalnym charakterem zmian. W pozostałych przypadkach, w których stwierdzono IP na poziomie 40–50% w warstwie podstawnej wykazano brak istotnych zaburzeń w architekturze tkankowej, a podziały mitotyczne występowały tylko w obszarach fizjologicznie im podlegających.

Zdaniem autorów duża wartość prognostyczna, prosta procedura wykonania oraz powtarzalność wyników uzyskanych w opisanym sposobie może stanowić przyczynek do oceny aktywności proliferacyjnej w codziennej praktyce diagnostycznej.

Reasumując, można stwierdzić, że ustalenie indeksu proliferacyjnego (IP) na podstawie wykonania badania immunohistochemicznego z zastosowaniem przeciwciała anty-Ki-67 MIB-1 zapewnia precyzyjną i obiektywną ocenę mikroskopową stopnia złośliwości w obrębie badanych zmian o nieokreślonym potencjale rozrostowym. Duże wartości indeksu proliferacyjnego (80–90%) zwykle świadczą o złośliwości procesu nowotworowego i jego szybkiej dynamice wzrostu.

## Piśmiennictwo

- [1] DUNKEL J., VAITTINEN S., GRENMAN R., KINNUNEN I., IRJALA H.: Prognostic markers in stage I oral cavity squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2013, 123, 2435–2441.
- [2] GAJEWSKA M., WIELGOŚ M., MARCZEWSKA J.: Assessment of activity of nuclear antygen Ki-67 in benign, borderline and malignant tumors. Assessment of selected risk factors of ovarian cancer. *Postępy Nauk Med.* 2013, 7, 452–456 [in Polish].
- [3] JONAT W., ARNOLD N.: Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? *Ann. Oncol.* 2011, 22, 500–502.
- [4] CATTORETTI G., BECKER M., DUCHROW M., SCHLUTER C., GALLE J., GERDES J.: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J. Pathol.* 1992, 168, 357–363.
- [5] KEY G., PETERSEN J., BECKER M., DUCHROW M., SCHLUTER C., ASKAA J., GERDES J.: New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections. *J. Clin. Pathol.* 1993, 46, 1080–1084.
- [6] SCHOLZEN T., GERDES J.: The Ki-67 Protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 2000, 182, 311–322.
- [7] SCHRODER R., BIEN K., KOTT R., MEYERS I., Vossing R.: The relationship between Ki-67 labeling and mitotic index in gliomas and meningiomas: demonstration of the variability of the intermitotic cycle time. *Acta Neuropathol.* 1999, 82, 389–394.
- [8] KANNAN S., CHANDRAN G., PILLAI K., MATHEW B., SUJATHAN K., NALINAKUMARY K., KRISHNAN M.: Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa: correlation with expression of Ki-67. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.* 1999, 49, M170–M175.
- [9] COLLINS K., JACKS T., PAVLETICH N.: The cell cycle and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 2776–2778.
- [10] HUMAYUN S., PRASAD V.: Expression of p53 protein and ki-67 antigen in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: an immunohistochemical study. *Nat. J. Maxillofacial Surg.* 2011, 2, 38–46.
- [11] VILAR E., SALAZAR R., PEREZ-GARCIA J., CORTES J., OBERG K., TABERNERO J.: Chemotherapy and role of the proliferation marker Ki-67 in digestive neuroendocrine tumors. *Endocrin. Rel. Cancer* 2007, 14, 221–232.
- [12] LEWY-TRENDI I., JANCZUKOWICZ J., WIERZCHNIEWSKA-ŁAWSKA A.: Practical application of proliferation markers' (MIB-1, PCNA, AgNOR) expression analysis for differential diagnostics of nodular thyroid lesions. *Wiad. Lek.* 2006, 59, 1–2 [in Polish].
- [13] BURCOMBE R., WILSON G., DOWSETT M., KHAN I., RICHMAN P., DALEY F., DETRE S., MAKRISS A.: Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2006, 8, 1–10.
- [14] BRYANT R., BANKS P., O'MALLEY D.: Ki-67 staining pattern as a diagnostic tool in the evaluation of lymphoproliferative disorders. *Histopathol.* 2006, 48, 505–515.
- [15] STĘPCZYŃSKI M., STELMACH R., JANAS A.: Evaluation of the diagnostic value of fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of the oral floor. *Twój Przeg. Stomatol.* 2012, 3, 26–30 [in Polish].
- [16] FIGUEIREDO P., LEITE A., FREITAS A., NASCIMENTO L., CAVALCANTI M., MELO N., GUERRA E.: Comparison between computed tomography and clinical evaluation in tumour/node stage and follow-up of oral cavity and oropharyngeal cancer. *Dentomaxillofac. Radiol.* 2010, 39, 3, DOI: <http://dx.doi.org/10.1259/dmfr/69910245>.
- [17] SOBIN L., GOSPODAROWICZ M., WITTEKIND C.: *TNM Classification of Malignant Tumours*. Wiley-Blackwell, VII edition, 2009, 16–17.
- [18] NABI U., NAGI A., SAMI W.: Ki-67 proliferating index and histological grade, type and stage of colorectal carcinoma. *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad* 2008, 20, 44–48.
- [19] MAHESHWARI V., SHARMA S., NARULA V., VERMA S., JAIN A., ALAM K.: Prognostic and predictive impact of Ki-67 in premalignant and malignant squamous cell lesions of oral cavity. *Int. J. Head Neck Surg.* 2013, 4, 61–65.
- [20] WYPYCHOWSKA I., BĄKIEWICZ A., SPORNY S.: Prognostic value of histological examination of renal cell carcinoma. *Urol. Pol.* 2008, 61, 55–60 [in Polish].
- [21] ERAMAH E., BUHMEIDA A., ABDALLA F., KHALED B., SALEM N., PYRHONEN S., COLLAN Y.: Prognostic value of proliferation markers: immunohistochemical Ki-67 expression and cytometric S-phase fraction of women with breast cancer in Lybia. *J. Cancer* 2012, 3, 421–431.
- [22] MOTTA R., ZETTLER C., CAMBRUZZI E., JOTZ G., BERNI R.: Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 2009, 75, 4 <http://dx.doi.org/10.1590/S1808-86942009000400013>.
- [23] PARK D., KARESEN R., NOREN T., SAUER T.: Ki-67 expression in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases: clinical implications. *Virchows Arch.* 2007. DOI: 10.1007/s00428-007-0435-2.

## Adres do korespondencji:

Paweł Milner  
ul. Tylna 4b m. 52  
90-364 Łódź  
Polska  
tel.: + 48 606 384 674  
e-mail: pawelmilner@wp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 25.06.2014 r.  
Po recenzji: 17.07.2014 r.  
Zaakceptowano do druku: 20.07.2014 r.

Received: 25.06.2014  
Revised: 17.07.2014  
Accepted: 20.07.2014

Konflikt interesów: nie występuje